

A tejelő tehén takarmányában leggyakrabban előforduló mikotoxinok „Mérges gombák” másképp

Kótiné dr. Seenger Julianna, Dr. Dégen László

Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft.

Napjainkban igen sok kérdés merül fel a takarmány eredetű toxinok hatásával, ártalmatlanításukkal, vagy termelődésük megelőzésével kapcsolatban. Többrészes cikksorozatunkban ismertetjük a tejelő szarvasmarha egészségi állapotára, és termelésére leginkább ható toxinokat, azok termelődését, a kiváltott tüneteket. Jelen cikkünk bevezetesként általánosságban mutatja be a mikotoxinokat.

A mikotoxin egy összetett kifejezés, előtagja a „gomba” jelentésű görög „mycos” szóból származik, utótagja pedig a latin „toxicum” szóból ered, amelynek jelentése „méreg”. A mikotoxinok a penészgombák toxikus anyagcsere-termékei (metabolitjai), amelyek egyes élelmiszerekben, takarmányokban fordulnak elő - így az állati és emberi szervezetre káros hatással vannak. Olyan kémiai eltérő, más és más vegyületcsoportba tartozó vegyületek, általában láthatatlan, ízetlen, stabil kémiai anyagok, amelyek ellenállnak a hőkezelésnek és a tárolás alatt sem bomlanak le. Ez azt jelenti, hogy a hagyományos takarmány-előállítás folyamatainak lépéseivel sem eliminálhatók, így a szennyezett takarmány káros hatással van az állati szervezetre, mikotoxikózist okozva. A kitétség leggyakrabban toxinnal szennyezett takarmány-felvétel útján alakul ki, de toxinokkal kapcsolatba kerülhet az állat belégzés útján is.

A takarmányokban előforduló mikroorganizmusok - ebbe beleértve a mikroszkópikus gombákat is - szaporodását az aktuális hőmérséklet és kiemelten a szubsztrát (jelen esetben a takarmány) relatív nedvességtartalma határozza meg.

Gombák elsődleges anyagcsere folyamatainak célja a gombatest felépítése és az életfunkciók biztosítása, a másodlagos metabolizmus során azonban olyan kémiai bonyolult szerkezetű metabolitok termelése zajlik, amelyek nem szükségesek a gomba normális életfolyamataihoz, és ezek közül sok toxikus hatású. A másodlagos metabolizmus termékei a gomba életfolyamataiban kettős funkciót töltenek be: A fitopatogén gombák patogén hatásaihoz szükséges anyagok, valamint a gombákat ért környezeti stresszorok hatására indukálódó stressz vegyületek.

A gombák toxintermelésére jellemző, hogy egy adott toxint több faj is termelhet, valamint egy adott faj többféle toxint is termelhet. A takarmány toxinfertőzöttségének felismerését nehezíti, hogy a gomba jelenléte nem feltétlenül jelenti a toxin jelenlétét is, valamint a gomba hiánya nem jelent egyúttal toxin mentességet is. Ismerünk atoxikus fajokat (telepeket), amelyek eddigi ismereteink szerint nem termelnek toxinokat, valamint toxinogén fajokat (illetve telepeket), amelyek meghatározott körülmények között toxin(ok) szintézisére képesek.


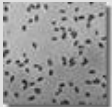


Jelenleg több, mint 400 mikotoxint ismerünk. A többszáz toxinból csak néhányat vizsgáltak mélyrehatóan, és ezeknek is csak egy részére van megfelelő kimutatási módszer. A leggyakrabban előforduló toxinokat 6 nagy csoportba sorolhatjuk: aflatoxinok, zearalenon, trichotecének, fumonizinek, ochratoxin és az ergot alkaloidok. A toxinokat különböző gombák termelhetik és minden gombafaj képes egynél több mikotoxint termelni.

A mikotoxinok biológiai hatásaiból említve egy párat, okozhatnak máj, vese és központi idegrendszer károsodást, lehetnek ösztrogén hatásúak. A tünetekről részletesen későbbi cikkünkben írunk, itt csak a főbb jellegzetességeket említjük. A tünetek toxinonként eltérőek lehetnek, de szerepet játszik az adott toxin más toxinokkal történő interakciója, illetve más stresszfaktor jelenléte is, ezáltal az állatok kevés vagy több változatos tünetet is mutathatnak.

A leginkább érintett csoport a frissfejős tehének, vélhetően a szupresszált immunrendszerük miatt. A tünetek magukba foglalják a csökkent takarmányfelvételt, váltakozó hasmenést (néha sötét és véres bélsár), étvágytalanságot, borzolt szőrzetet, csökkent reprodukív teljesítményt beleértve a rendszertelen ösztruszt, embrió elhalást, vemhes tehén ösztrusz tüneteit mutatja és csökkent vemhesülési arányt. Egyes betegségek előfordulása gyakoribbá válhat, úgy mint oltógyomor helyzetváltozás, ketózis, magzatburok visszatartás, méhgyulladás, tőgygyulladás, és zsírmáj-szindróma. A tehén rosszul reagál az állatorvosi terápiára.

Nézzük, melyek a leggyakoribb mikotoxin-termelő gombák és azok toxinjai:

1. táblázat: A mikotoxin termelő gombák csoportosítása

A mikotoxin termelő gombák nagy csoportjai	Gomba fajok	Mikotoxinok
Aspergillus 	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. pseudotamarii</i>	Aflatoxin (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)
	<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxin (Ochratoxin A)
	<i>A. clavatus</i> <i>A. terreus</i>	Patulin
	<i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	Ciklopiazon sav (CPA)
Claviceps 	<i>C. purpurea</i> <i>C. fusiformis</i> <i>C. paspali</i> <i>C. africana</i>	Penitrem A <u>Ergot alkaloidok:</u> Klavinok (Argroklavin) Lizergsav lizergsav-amidok (Ergin) Ergopeptinek (Ergotamin, Ergovalin)
Fusarium 	<i>F. verticillioides</i> (syn. <i>F. moniliforme</i>) <i>F. proliferatum</i>	Fumonizin (B ₁ , B ₂ , B ₃) Fusar-sav
	<i>F. graminearum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i>	<u>A típusú Trichothecének</u> T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxiszcirpenol
	<i>F. poae</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. crookwellense</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	<u>B típusú Trichothecének</u> nivalenol, deoxynivalenol (DON), fusarenon-X
	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenon
Penicillium 	<i>P. verrucosum</i> <i>P. viridicatum</i>	Ochratoxin (Ochratoxin A)
	<i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	Citrinin
	<i>P. roqueforti</i>	Roquefortin PR toxin Pentirem A
	<i>P. cyclopium</i> <i>P. camemberti</i>	Ciklopiazon-sav (CPA) Pentirem A
	<i>P. expansum</i> <i>P. claviforme</i>	Patulin
Neotyphodium (korábban <i>Acremonium</i>)	<i>N. coenophialum</i>	Ergot alkaloidok, lolinok, peramin
	<i>N. lolii</i>	Lolitretek, peramin, ergot alkaloid (ergovalin)
Pithomyces	<i>P. chartarum</i>	Sporidezmin

Az aflatoxinokat elsősorban az *Aspergillus flavus* és az *A. parasiticus* gomba termeli, amelyek hatása krónikus gyulladások kialakulásától, illetve a daganatképződéstől egészen a halál beálltáig terjedhet. Az aflatoxinok elnevezése a toxinnal fertőzött földidió dara vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata során mutatott fluoreszcens szín alapján történt: kékes szín (blue) - aflatoxin B1 és B2, zöldes szín (green) - aflatoxin G1 és G2. A tej vizsgálata során egy kékeslila színnel fluoreszkáló metabolitot fedeztek fel, amelyet nem színe, hanem eredete alapján aflatoxin M1-nek neveztek el. A juhok vizeletében egy, a tejben talált metabolithoz nagyon hasonló vegyületet találtak, amely az aflatoxin M2 elnevezést kapta.



Az ochratoxint elsősorban a *Penicillium verrucosum* termeli. Az ochratoxin mérgezésre érzékeny fajok a sertés és a baromfi. Elsősorban vesebántalmakat és hasnyálmirigy károsodást tud okozni.

A trichotecének a mikotoxinok széles családját alkotja, amelyet több gomba is termel, mint a *Fusarium* vagy a *Stachybotris* fajok. A legnagyobb valószínűséggel előforduló trichotecén a deoxinivalenol (vomitoxin vagy DON), amely elsősorban búzában, árpában és kukoricában található meg. Egy másik, Európában gyakran előforduló trichotecén a T-2 toxin. A toxin termelődése stresszhatásra indulhat el, és a szintézis egyes lépéseinél elágazódás lehetséges. (Pl. DON, DAS ill. T-2 képződés). A kiindulási T-2 képződés mellett a gombában, vagy az állati szervezetben hidroxiláció folytán a HT-2 kialakulása is előfordul. A HT-2 hatása súlyosabb, kisebb mennyiségben azonos hatással rendelkezik.

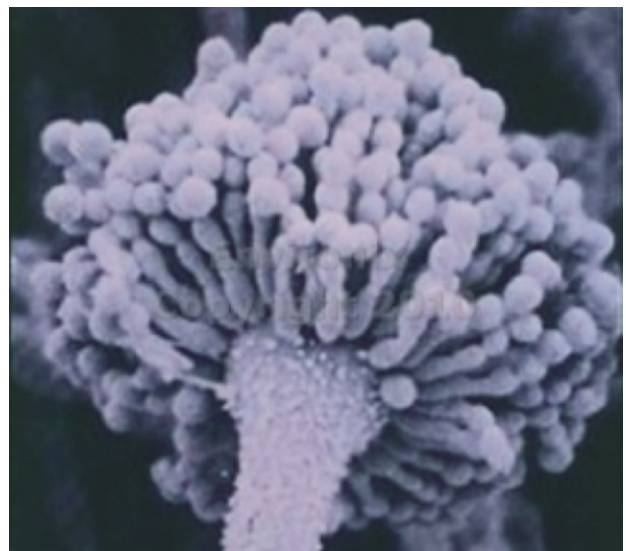
A fumonizin A és B toxin rendkívül stabil vegyület elsősorban a kukoricánál található meg és a *Fusarium verticillioides* gomba termeli. Ez a toxin jelentős betegséget tud okozni lovaknál és sertéseknél. Egereknél és patkányoknál rákképző hatásukat is kimutatták.

A zearalenon toxint elsősorban a *Fusarium graminearum* gomba termeli, sertéseknél méhszájgyulladást okoz és ösztrogén hatással van. A zearalenon a trichotecénekkal együtt is előfordulhat a búzában, árpában, zabban, kukoricánál. Ösztrogén-szerű hatása miatt teheneknél vemhesülési problémákat okoz.

Az ergot alkaloidokat a *Claviceps* gombafaj (növényi patogén) okozza, amikor a szövetelváltozás folytán áttelelő szklerociumok képződnek. Az ergotoxikózis már a középkorban is ismert betegség volt. A mikotoxinok kisebb csoportjába tartoznak azok a toxinok, amelyek eseti alapon fordulnak elő és általában társulnak az emberi és állati mikotoxinokhoz, vagy gyakran fordulnak elő, de nem társulnak emberi és állati betegségekhez.

A cikksorozat következő részében részletesebben térünk ki egyes toxinok tejelő állományokban okozott káros hatásaira.

(A cikkhez felhasznált irodalmak forrása a szerzőknél elérhető)



A tejelő tehen takarmányában leggyakrabban előforduló mikotoxinok 2.

A toxinok által okozott problémák - a diagnózis nehézségei

Kótiné dr. Seenger Julianna, Dr. Dégen László, Dr. Monostori Attila

Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft.

Előző cikkünkben (Partnertájékoztató Hírlevél 2014/5) általánosságban ismertettük a tejelő tehenek takarmányában és a tejben előforduló toxinokat, és az azokat termelő gombákat. Nézzük most meg ezeket részletesebben.

A mikotoxinok káros hatásai

Habár a penészes takarmány és élelmiszer fogyasztásának káros hatása már több éve ismert a mikotoxikológia, azaz a mikotoxinok vizsgálatával foglalkozó tudomány az 1960-as években kezdett kialakulni a Turkey-X betegség megjelenésével Angliában. Ezt a betegséget Brazíliából importált földimogyoró liszttel hozták kapcsolatba. Egy intenzív multidiszciplináris kutatási munka eredményeként egy kéken fluoreszkáló toxint izoláltak, melyről bebizonyosodott, hogy az *Aspergillus flavus* gomba termeli, így a kémiai és biológiailag karakterizált toxint aflatoxinak nevezték el. Állati kísérleteken kimutatták az aflatoxin rendkívül káros és karcinogén hatását, valamint felismerték a tejelő tehenek tejében a toxikus metabolitját. Az aflatoxin és hatásának felismerésével indult meg a penészes takarmányok által okozott egészségügyi és termelési problémák vizsgálata, majd ez vezetett a többi toxin felfedezéséhez is.

A mikotoxinok magas dózisban akut egészségügyi vagy termelési problémákat okozhatnak, azonban a mikotoxinok bendőbeli lebontása megvédi a tehenet az akut toxikózistól, mely során a toxinok elvesztik hatásuk egy részét. Azonban nem minden toxin bomlik le teljesen és néhányuknál maradhat vissza toxikus bomlási termék. A toxinok degradációjának mértéke 0-90%-os hatékonyságú lehet, és ez inkább a protozoák aktivitásától függ, mintsem a bakteriális aktivitástól. Figyelembe kell venni azonban, hogy minden olyan hatás, amely pH csökkenéshez és bendőacidózishoz vezet, pusztítja a mikroorganizmusok és a protozoák számát, és ezáltal csökken a detoxikálás hatékonysága. Továbbá minden

folyamat, amely gyorsítja a takarmány előgyomrokon való áthaladásának sebességét, szintén csökkenti a lebontás hatékonyságát.

A fentiek alapján a kockázatot elsősorban a hosszú távú, mérsékelt dózisú mikotoxin fogyasztás jelenti, amely krónikus problémákhoz vezethet.

A mikotoxinok különféleképpen fejthetik ki hatásukat. Csökkenthetik a takarmányfelvételt vagy takarmány visszautasítást okozhatnak, csökkentik a táplálóanyag-felszívódást, anyagforgalmi zavarokat idézhetnek elő, megváltoztathatják az endokrin és exokrin folyamatokat, immunszuppresszált állapotot idézhetnek elő, megváltoztathatják a mikrobák szaporodását.

A tünetek általánosságban a következők lehetnek: csökkent termelés, csökkent takarmányfelvétel, vagy takarmány visszautasítás, visszatérő hasmenéses tünetek (néha véres vagy fekete bélsár), durva szőrtakaró, csökkent szaporodásbiológiai teljesítmény, szabálytalan ivarzás, embrióelhalás, ivarzási tüneteket mutató vemhes tehen, csökkent termékenyülési index. Általában az oltógyomor helyzetváltozás, ketózis és magzatburok visszatartás gyakoribbá válik.

A mikotoxinok jelentőségének megismerését az állati termék előállításban a diagnózis felállításának nehézségei, a kevés kutatási eredmény, a tételmintázás nehézségei és az analitikai módszerek változó mértékű hibái korlátozzák.

A toxinok által kiváltott tünetek megjelenése és jellege igen változatos, ami zavaró a diagnosztizálás során. Ezt tovább bonyolítja, ha több mikotoxin egyidejűleg hat, illetve ha más tényezőkkel interferál. A több hatásra kialakuló, vagy opportunistá betegségek által kiváltott tünetek nehezítik vagy lehetetlenné teszik a diagnózist, mivel a komplex klinikai eredmények a tünetek széles skálájával párosulnak. Az említett nehézségek miatt a mikotoxin által okozott problémák felismerése, diagnózisa egy sor kizáráson és következtetésen alapul, melyhez a következő szempontok szolgálhatnak segítségül:

- 1) Termeléses csökkenés esetén és a betegségek megjelenésekor elsődleges kiváltó okként a mikotoxinokra kell gondolni.
- 2) A kórokozóknál vagy egyéb fajoknál a gyakorlatban történő beazonosításhoz a már dokumentált tüneti leírásokat fel lehet használni.
- 3) Mind a szisztémás hatás, mind a célszerv károsítása lehetséges hatásra utalhat.
- 4) A post mortem vizsgálatok nem minden esetben mutatnak többet, mint bél irritáció, ödéma, általános szövetgyulladás.
- 5) A mikotoxinok immunszuppresszív hatása miatt a betegségek gyakoribb megjelenése, illetve atípusos előfordulása figyelhető meg.
- 6) A takarmányhoz adagolt toxinkötők, illetve a kontaminált takarmány hígítása segíthet a diagnózisban.
- 7) Takarmány vizsgálatokat kell végezteni, azonban a megfelelő mintázás problémát jelenthet.

Legtöbb esetben a természetes módon szennyezett takarmányok toxintartalma sokkal nagyobb mértékben fejt ki hatását a szervezetben, mint a tisztított toxinokkal mesterségesen kezelt esetében. Feltételezhetően azért, mert a természetes kontaminációval érintett takarmányokban egyszerre többféle gomba és többféle toxin van jelen, amelyek interakcióba léphetnek egymással (vagy eddig ismeretlen mikotoxinokkal). Éppen az interakció miatt nehéz megállapítani a biztonságos határértékeket egyes toxinokra. Tovább nehezíti a dolgot, hogy a toxinok másként fejtik ki hatásukat fajoként, ivaronként, illetve környezeti stresszhatások alatt. Kimutatták, hogy az üzemi körülmények közötti hatások igen nagy mértékben eltérnek a laboratóriumi körülményektől. Egyes takarmánykomponensek, mint pl. a zsír, fehérje, rost, vitaminok és ásványi anyagok is befolyásolhatják a toxinok hatását.

A mikotoxinok egyedi hatásai... vagy nem is olyan egyediek?

Aflatoxinok

Az aflatoxinok elsősorban az *Aspergillus flavus* és az *Aspergillus parasiticus* által termelt igen toxikus, karcinogén és mutagén hatású vegyületek. A B1, G1 és az M1 változatok rendkívül toxikus dihidrofurano-furánok (DHFF), míg a B2, G2, M2 tetrahydrofurano-furán (THFF) változatok kevésbé toxikusak. Toxikus hatásaik közé tartoznak májkárosító hatás, mitózisgátlás, teratogén, immunszuppresszív és hepatokarcinogén hatások. A hepatokarcinogén hatásért leginkább a B és G csoportból a szervezetben - elsősorban a májban - keletkező epoxi metabolitok felelősek.

Az aflatoxin hatásának kezdetben nincsenek tipikus tünetei, jellemző az étvágytalanság, csökkent növekedés, anémia, illetve kórokozóknál a bendőmozgások számának csökkenése. Tartósan aflatoxinnal szennyezett takarmány hatására kialakult tünetek csak kórszövettanilag specifikálhatók. Az elváltozások megmutatkozhatnak az epe erek kóros proliferációjában, aranyárga színű májelfajulásban, illetve az izmokban haemorrhagiás foltok is láthatók. A legsúlyosabb gazdasági károkat azonban az immunszuppresszió okozza. Másodlagos hatásként az influenza és a mycoplasma fertőzés okozta megbetegedések súlyosbodhatnak. A fiatal és a vemhes állatok fokozottan érzékenyek az aflatoxin mérgezésre. A toxin hatása interferál a vakcinázás indukálta immunitással.

Az aflatoxin a gombát érő stresszhatásra képződik, másodlagos metabolizmus során. A folyamat elindításában a hőstressz proteinek és egyéb ismeretlen faktorok játszanak szerepet. Habár az aflatoxin kórokozóknál egészséges bendő pH mellett gyorsan bomlik, azonban intenzív tejtermelő állományokban nagyobb kihívást jelent a megfelelő pH fenntartása, valamint a gyorsabb bendőpasszázs miatt kevesebb toxin bomlik le a bendőben.

Szervekben akkumulálódhat és a termékekkel kiválasztódik (tej!, tojás). Az aflatoxin B1 aflatoxin M1 formában választódik ki tejjel. Hozzávetőlegesen úgy számolhatunk, hogy TMR szárazanyag tartalmára megállapított aflatoxin B1 koncentrációjának 20%-a a tehén szervezetében marad, megbetegedéseket okozva, 20%-a bendő mikroorganizmusokkal ürül a bélsárral, 60%-a pedig metabolitok formájában ürül a bélsárral és vizelettel. A tejjel ürülő aflatoxin M1 tartalom a TMR szárazanyag tartalomra megállapított Aflatoxin B1 koncentrációjának átlagosan 1,7%-a (0,8-2%).

Az aflatoxint 1988-ban felvették az emberekben rákot okozó anyagok listájára, ezért elméletileg az nyomokban is rákot okozhat, azonban a szigorú szabályozás miatt nincs embereket érintő reális élelmiszerbiztonsági kockázata, ehhez azonban folyamatos takarmány és élelmiszer vizsgálatra van szükség!

Deoxynivalenol (DON) vagy Vomitoxin

A Deoxynivalenol egy *Fusarium* által termelt trichotecén vázas mikotoxin, amely gyakran fordul elő takarmányban. Köznapi nyelven vomitoxin (vomit - hányás), mert sertésnél hányást okoz. Régebben a hányást csak a DON-nak tulajdonították, de ma már bebizonyosodott, hogy a fuzársavval történő interakciója váltja ki ezt a hatást.

A trichotecén mikotoxinok a májban metabolizálódnak. A szövetekben kevésbé stabilak, a szervezetben nem akkumulálódnak és gyorsan ürülnek. Kórokozóknál a

bendőben deoxidálódnak, de csak 5,6 pH értéken. Tejjel gyakorlatilag nem ürül a szervezetből.

A DON tejelő állományokra gyakorolt közvetlen hatását még nem bizonyították, de klinikai vizsgálatok során, illetve indirekt módon, toxinkötő használatával kimutatható volt a csökkent tejtermelés DON toxinnal szennyezett takarmánnyal (2600 - 6500 ppb konc.) etetett állatoknál. A DON toxint összefüggésbe hozták a bendőbeli fermentáció megváltozásával, és a hasznosítható fehérje duodenum felé történő csökkent áramlásával.

A DON egyik jelentősége abban rejlik, hogy markerként működhet és jelenlétéből következtethetünk arra, hogy a takarmány ki volt-e téve olyan körülményeknek, amely penész képződéshez, ezáltal más toxinok termelődéséhez vezethetett.

T2 toxin

A T2 toxin egy rendkívül potens, *Fusarium* fajok által termelt trichotecén vázas mikotoxin, amely a takarmány mintákban kisebb gyakorisággal fordul elő. A toxin termelődésének kiváltó tényezője itt is a stresszhatás lehet a hő-schock proteineken keresztül. A trichotecén vázas toxinok szintézisének egyes lépéseinél elágazódás lehetséges. Pl. DON, DAS ill. T-2 képződés. A kiindulási T-2 képződés mellett a gombában vagy az állati szervezetben hidroxiláció folytán a HT-2 kialakulása is előfordul. A HT-2 hatása súlyosabb, kisebb mennyiségben azonos hatással rendelkezik.

A T2 hatása kevésbé ismert a szarvasmarha fajban, mint a laborállatok körében. Egy dokumentált kísérletben 20 napon át történő 640 ppb-vel terhelt takarmány etetése véres trágyát ill. enteritist okozott, oltógyomor és bendő fekélyhez, valamint elhulláshoz vezetett. Más szerzők takarmány visszautasításról és gastrointestinalis felmaródásokról írtak, de haemorrhagiát nem találtak. A toxin hatásaként az ösztrozus elmaradást, borjaknál csökkent fehérje szintézisből adódó csökkent immunműködést, alacsony fehérvérsejt és neutrofil számot figyeltek még meg.

Zearalenon (ZEA, F2)

A Zearalenon szintén egy fuzárium-toxin, amelynek kémiai szerkezete nagyon hasonlít az ösztrogénre, így az ösztrogén választ válthat ki az állati szervezetben. Nem laktáló teheneken végzett vizsgálat során, 25 ppm átlagos ZEA koncentrációjú adagot etetve a sárgatest méretének csökkenésén kívül más tünetet nem mutattak az állatok. Egy másik kísérletben ugyanilyen koncentrációjú (25 ppm ZEA) adagot etetve az üszők esetében a termékenyítési index 25%-kal csökkent. Többen számoltak be a kérődzőknél ösztrogén válaszról és vetelésről. A

tünetek között szerepeltek a vaginitis, hüvelyváladékozás, alacsony reprodukív teljesítmény, és duzzadt tőgy-mirigyek szűzűszőknél. Egy üzemi kísérlet során ZEA-val és DON-nal szennyezett takarmány hatásaként csökkent takarmányfelvételt és tejtermelést, hasmenést, gyakoribbá váló ivari traktus fertőzéseket és szaporodásbiológiai problémákat figyeltek meg. Új-zélandi kutatók szintén ZEA-val szennyezett takarmányt etettek tejelő állományban, és ellenőrzésként a zearalenon metabolitjait visszamérték vérből, hogy meg tudják becsülni az egyes egyedek mennyi toxint fogyasztottak. A palpációs vizsgálatok eredményével összevetve azt találták, hogy az ivarzó egyedek vérében alacsonyabb volt a zearalenon metabolitjainak szintje, mint a nem ivarzókéban. A szerzők 440 ppb ZEA koncentrációjú takarmány etetésével hozták összefüggésbe a szaporodásbiológiai problémákat.

Fumonizin (FB)

A *F. verticillioides* által termelt Fumonizin B1-et (FB1) 1988-ban izolálták először. Leukoencephalomaláciát okoz lovaknál, tüdőödémát sertéseknél és hepatotoxikus embereknél. Karcinogén anyag a patkányoknál és egereknél, és feltehetően a nyelőcső daganat kialakulására hajlamosít embernél. A fumonizinek szerkezetileg nagyon hasonlítanak a szfingolipidekhez, amelyek magas koncentrációban vannak jelen az egyes idegszövetekben, mint pl. a myelin. A fumonizin pont ezeknek a szfingolipideknek a bioszintézisét gátolja, így az egyes idegszövetek a toxikózis hatására elhalnak.

Habár a FB1 sokkal kevésbé veszélyes a kérődzőkre, mint a sertéseknél, a toxikusságát kimutatták juhoknál, kecskéknél, valamint húsmarha borjaknál és tejelő teheneknél is. FB1-gyel (148 ppm) szennyezett takarmány bikaborjakkal történő etetésénél májléziókat találtak, a csoport limfocita blasztogenezist és májkárosodást jelző enzimszint emelkedést mutatott. Tejelő marháknál a toxin adagolásra (100 ppm) bekövetkező tejtermelés csökkenést elsősorban az alacsonyabb takarmányfelvételnek tulajdonították. Mivel a tejelő állományok nagyobb mértékben vannak kitéve a stressztényezőknek, így azok érzékenyebbek lehetnek a fumonizinek hatására, mint a húsmarhák.

Ergot alkaloidok, anyarozs toxicitás

Az egyik legrégebben felismert mikotoxicitás az ergot alkaloidok általi ergotizmus. A *Claviceps* különböző fajai termelik, amely megfertőzi a növényt és a kis szemnyi méretű fekete szkleróciumokban toxint termelnek.

Az ergotizmus elsősorban üszkösödést és idegi problémákat okoz állatoknál. A tünetek megnyilvánulását közvetlenül meghatározza a takarmány anyarozs

tartalma, csökkenő napi testtömeg gyarapodást, sántaságot, alacsonyabb tejhozamot, agalactiát és immunszuppressziót okoz. 0,3% feletti szklerócium-koncentráció szaporodásbiológiai rendellenességekhez vezet. A *Neotyphodium* vagy *Epichloa* fertőzött csenkeszek toxikus alkaloidákat tartalmazhatnak, amely „csenkesz-mérgezést” okozhat. A tünetek lehetnek: alacsony testtömeg gyarapodás, durva szőrzet, megnövekedett testhőmérséklet, agalactia, rossz termékenyülés, és a testvégek, mint pl. láb, fark, fül üszkösödése. Az Egyesült Államok közép-keleti és déli régióiban igen nagy területen van csenkeszes legelő. Mivel a csenkeszek 50%-a endofita fertőzött, így a csenkessel legeltetett marhaállomány - amely az USA állományának 20%-át teszi ki -, nagymértékben ki van téve a fertőzésveszélynek.

Ochratoxin A

A *Penicillium*ok és *Aspergillus*ok által termelt Ochratoxin A (OTA) egy vesét károsító anyag, amelyet sertéseknél 'mikotoxin sertés nefropátia'-nak írtak le. Működése során elsősorban a proteinszintézist gátolja. Marháknál az OTA hamar lebomlik (15 perc alatt 50%-os csökkenés mutatható ki a bendőben), így azt feltételezték, hogy elenyésző gondot okoz az állományban, hacsak nem etetik preruminális korban lévő állatokkal. Magas arányú abrak etetése során azonban kevesebb OTA bomlik le a bendőben, így ebben az esetben az toxikusabb lehet. A bendőműködés kialakulásáig azonban a borjakra fokozottan veszélyes! A *ochraceus*-szal fertőzött lucernaszénában találtak OTA-t, amelyet összefüggésbe hoztak marhák vetelésével, továbbá OTA-val szennyezett tömegtakarmány is vezethet elhulláshoz marháknál.

PR toxin

A PR egy a különböző toxinok közül, amelyet az alacsony pH-jú és hűvös párás körülmények közt növekedő, a szilázsokban gyakran előforduló *Penicillium* penészek termelnek. A *P.roquefortii* által termelt PR toxin a penészes silókukoricában előforduló, gondot okozó vegyület. Egy európai fű- és kukoricaszilázsokat feldolgozó tanulmány a minták 40%-ában talált *P. roquefortii*-t amelyeket szarvasmarha rendellenességekkel társítottak. A PR toxin akut toxicitást okozott egereknél, patkányoknál és macskáknál, megnövelve a kapillárisok permeabilitását, amely a tüdő, a szív, a máj és a vese közvetlen károsodásához vezetett, valamint egy esettanulmányban vetelés és magzatburok visszatartás feltételezett okozójaként írták le. Más, a szilázsokban *Penicillium* által termelt mikotoxinokat - mint a roquefortin C és a mikofenolsav - kapcsolatba hoztak állományegészségi problémákkal.

Patulin

A patulint a *Penicillium*, *Aspergillus* és *Byssochlamys* fajok termelik. Elsősorban penészes gyümölcsökben fordul elő, mint pl. az almában, de kimutatták már gabonában, főként nedves terményben és szilázsban. A patulinnak antibiotikus hatása van a gram-pozitív baktériumokkal szemben. Bendőkultúrához adagolva csökkentette az illózsírsav termelést, a rostbontást és a baktérium szaporodást. Állományok patulin mérgezésének esélye igen kicsi, de a toxicitásról már készült esettanulmány.

Citrinin

A citrinin OTA-val együttesen fordulhat elő, mind a *Penicillium* mind az *Aspergillus* termeli, és ugyanúgy, mint az OTA-nak, a citrininnek is célszerve a vese. A citrinin egy paraszimpatikus idegrendszer stimuláló anyag, amely a vese csöves epithél sejtjeinek elhalását okozza és néhány esetben hepatotoxikus.

Jelent-e ez számunkra veszélyt?

A szarvasmarhákat érintő egészségügyi veszély fennáll, mégpedig a zearalenon és fitoösztrogének okozta szaporodásbiológiai zavarok valamint a fiatal borjak ochratoxikózisa esetében. Figyelnünk kell azonban az aflatoxikózis veszélyére is (amely jelenlegi körülmények között csak trópusokon és szubtrópusi vidékeken jelent reális veszélyt - ténylegesen az aflatoxikózishoz 300-700 ppb aflatoxin koncentráció kell a takarmányban).

Ugyanazon faktorok miatt, amelyek megnehezítik a diagnózist, azok miatt nehéz megállapítani a biztonságos határértékeket is. Hazánkban olyan mértékű toxin határértékek és ajánlások vannak érvényben, amelyek betartása mellett gyakorlatilag nem kell tartanunk attól, hogy tejjel vagy szarvasmarha hússal a egészséget veszélyeztető mennyiségben mikotoxinok kerülhetnek a fogyasztók szervezetébe. A határértékekről azonban a következő részünkben írunk.

(A cikkhez felhasznált irodalmak a szerzőknél elérhetők.)



A tejelő tehen takarmányában leggyakrabban előforduló mikotoxinok 3.

Mikotoxinok kimutatása takarmányokból

Kótiné dr. Seenger Julianna, Dr. Dégen László

Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft.

A takarmányok mikotoxin tartalmának meghatározására számos módszer létezik, amelyek nagy része kereskedelmi forgalomban elérhető, így az adott körülményekhez leginkább alkalmas mérési módszert tudjuk kiválasztani.

Az ÁT Kft Takarmányanalitikai laboratóriumának megnyitásakor az ELISA módszer bevezetése mellett döntött. A módszer kiválasztásánál igen sok szempontot kellett figyelembe vennünk. Fontos volt, hogy a módszer kvantitatív legyen, tehát számszerűsítve meg lehessen mondani az adott takarmány toxin koncentrációját és a lehetőség megteremtése, hogy minél több toxin vizsgálatát elvégezhessük. Mivel elsősorban a tejtermelők által beküldött és takarmányozásra szánt tételeket vagy TMR-alapanyagokat vizsgálunk be, így egy aránylag olcsó és gyors módszert kerestünk. A gyors tesztek bevezetését elvetettük, mert a precíz laboratóriumi háttér és a szakmai személyzet adott volt a magasabb szintű minta előkészítéshez, továbbá a specifikusabb, megbízhatóbb eredményeket produkáló eljárások használatához.

Nézzük, milyen módszerek közül lehet választani, amennyiben takarmányunk mikotoxin tartalmát szeretnénk meghatároz(tat)ni. Alábbiakban a leggyakoribb eljárásokat sorakoztatjuk fel, valamint bemutatjuk, melyiknél mi is a meghatározás alapja.

Egyes gyors teszteknel, az **immunkromatográfiás tesztcsíkokon** két zóna van egymás mellett kialakítva: egy teszt- és egy kontroll zóna. A megfelelően előkészített takarmánykivonatot felvisszük a tesztcsíkra, amely elkezd áramlani a membránon és áthalad a teszt és a kontroll zónákon. A teszt a vizsgált komponenst egy specifikus antitesthez kapcsolva mutatja ki a teszt zónában. A toxin koncentrációjától függően vagy mind a teszt- és a kontroll vonal látható lesz, vagy csak a kontroll vonal. Első esetben toxinnal terhelt az adott takarmány, a második esetben nem éri el a minta toxinkoncentrációja a teszt kimutatási határát, de a kontroll vonal visszaigazolja számunkra, hogy a tesztcsík működik. A tesztcsíkot értékelhetjük szabad szemmel, azonban ha mennyiségi eredményekre van szükségünk, a

kiértékelést egy műszerrel végezzük el. Ez egy gyors, könnyen elvégezhető technika, akár a mintavétel helyén alkalmazható. Ezek a tesztek alapvetően egyszerű mintamátrixokra lettek validálva, azaz használatuk takarmány-alapanyagok szűrővizsgálatára javasolt.

Az aflatoxinok természetes erős fluoreszcens tulajdonságát használják ki a **fluorimetriás vizsgálati rendszerek**. A mintaextrakciót követően eltávolítják a mintából a vizsgálatot megzavaró komponenseket, majd egy származékképzéssel felerősítik a vizsgált anyag fluoreszcens tulajdonságait. A gerjesztés hatására a tisztított aflatoxin által kibocsátott fényt fluoriméterrel értékelik. Habár ez a gyors módszer is könnyen elvégezhető és költséghatékony, azonban csak az aflatoxinok meghatározására kínál megoldást.

A gyors tesztek előnye, hogy azonnal, akár helyben eredményt kaphatunk, azonban a tesztcsíkok által kimutatott eredmények pontosságát általában nagyobb szórásértékek jellemezhetik.

Az **ELISA** (enzimhez kapcsolt immunsorbens vizsgálat ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) módszer lényegében mindig egy adott antigénre specifikus antitest, más néven ellenanyag kötődésén és annak kimutatásán alapuló módszer. Széles körben alkalmazott módszer, mely megbízhatóan alkalmazható mikotoxin vizsgálatok esetében is, mivel az antitestek kiválóan meg tudják különböztetni a mikotoxinok háromdimenziós szerkezetét, és specifikusan képesek kötni azokat. Toxinmeghatározásra a laborokban leggyakrabban kompetitív ELISA módszert használnak, amely oldott fázisban található kis mennyiségű antigén kimutatására alkalmas.

Az eljárás lényegét a szendvics ELISA módszerén keresztül ismertetjük. A módszer azon alapul, hogy az antigén felületén több olyan régió van, amelyhez ellenanyag készíthető. A kitekben lévő vizsgálati tálca (mikrotiter lemez) kis medencéinek aljához már eleve rögzítve vannak a specifikus antitestek, amelyek csúcsi része képes megkötni az adott toxint. Ezt úgy kell elképzelni, mint a zár-kulcs működési elvét, csak a megfelelő tollazatú kulcs passzol a zárba, azaz csak az

adott formájú antigén tud megkötődni az antitest felszínén. A toxint tartalmazó oldat hozzáadásával kialakulnak a speciális kötések, azaz minden toxin „beül” az antitest receptoraiba és ott rögzül. Fontos, hogy a felületen több antigén kötőhely legyen, mint amennyi antigén (toxin) a mintában van, így mindegyik megkötésére adott a lehetőség. Azok az anyagok, amelyeket nem tudott megkötni az antitest, mert eltérő volt az alakjuk, azokat lemoszuk. A kialakult antitest-antigén együtteshez hozzáadunk egy másodlagos antitestet, mintegy sapkát, amelyhez egy reaktív enzim van hozzákapcsolva. Ez a másodlagos antitest tehát csak már megkötött toxinok tetejére tud „ráülni” és megkötődni. Fontos, hogy ez is feleslegben legyen a minta antigén-tartalmához képest, tehát minden antigénhez kötődjön egy ellenanyag. Így a vizsgálandó antigént egy „szendvics” komplexbe zártuk. A felesleges másodlagos antitesteket szintén lemoszuk. A másodlagos antitesthez kötött enzim - gyakran tormaperoxidáz - egy hozzáadott kromogén anyagot az enzimreakció következtében színes terméké alakít, ezzel mutatva az antigén-antitest kapcsolódásokat, azaz minden olyan kapcsolódást, ahol a toxint a két antitest magába zárta. Az átalakított kromogén anyag mennyisége arányos az enzimaktivitással, amely a megkötött antigén mennyiségének függvénye. Az abszorbanciát fotométerrel mérjük. A módszer - ismert koncentrációjú sztenderdek segítségével - a pontos mennyiség meghatározására is alkalmas.

Laborunkban olyan kompetitív ELISA módszert használunk, amely abban különbözik a fenti módszertől, hogy a mikrotiter lemez felületéhez antigének vannak rögzítve, ehhez adjuk hozzá a mintát, amely szintén antigént (toxint) tartalmaz. A mintával együtt ismert mennyiségű, de korlátozott számú ellenanyagot adunk a cellákba. A mintában jelenlévő ismeretlen mennyiségű, oldott antigén (toxin) hozzáköt az ellenanyagokhoz és így gátolja azok kötődését a lemezhez rögzített antigénhez. Itt a fotométerrel mért abszorbancia a vizsgálandó antigén koncentrációjával fordítottan arányos, hiszen minél több a takarmányunkban a toxin, annál több ellenanyagot köt meg, így annál kevesebb ellenanyag kötődik a felületen eredetileg rögzített, a vizsgálat során mért antigénekhez.

Az új és innovatív **ELISA módszeren alapuló Biochip technológia** lényegében megegyezik az ELISA módszernél leírtakkal, annyival kiegészítve, hogy a vizsgáló kerámialapra felvitt egy adott mintából több elkülönített vizsgálati helyen különböző toxinokat tudunk egyszerre kimutatni. Tehát például egy vizsgálati lemezen van egy aflatoxin B1/B2 megkötő, egy DON megkötő, egy T2 megkötő, és egy fumonisin megkötő hely. Az enzim ebben az esetben nem egy színreakciót, hanem egy fényreakciót generál, amelyet egy nagyfelbontású kamerával detektálunk sötétben. *Hatalmas előnyt jelent ez olyan időszakban,*

amikor egyszerre több toxin előfordulására számíthatunk, illetve kiválóan alkalmazható takarmánybázisunk monitorozására.

A mikotoxinok élelmiszerekből és takarmányokból való kimutatására vonatkozó hazai és nemzetközi szabványok az érzékenységüknek és pontosságuknak köszönhetően **HPLC** vagy vékonyréteg kromatográfiai módszereken alapszanak.

A műszeres analízis kromatográfiai módszerei arra szolgálnak, hogy a minta komponenseit egymástól elválasszák. A módszer működésének alapja az, hogy a mozgófázisba (amely gáz vagy folyadék lehet) kevert mintaelegyet szoros kontaktusba hozzuk egy azzal nem elegyedő másik fázissal, amelyet állófázisnak hívunk. A mozgófázist állandóan mozgásban tartva a mintaelegy komponensei - az állófázissal való kölcsönhatásuk különböző mértéke miatt - megfelelő kontaktidő után elkülönülnek egymástól. Amennyiben a rendszerben egy detektort helyezünk el, amely a mintakomponenseket képes megkülönböztetni a minta oldószerétől, akkor a detektorjel idő függvényében való ábrázolásakor a mintakomponenseket reprezentáló csúcscsoportot fogunk észlelni. Ezt a grafikont hívjuk kromatogramnak, a berendezést pedig kromatográfának. A folyadékkromatográfia ma elterjedten alkalmazott változata a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, ahol a mozgófázis áramoltatása csak nagy nyomással lehetséges. Azt, hogy az oszlop milyen komponensek hatékony elválasztására alkalmas, a kapcsolt megosztófolyadék kémiai tulajdonságai döntenek el. Toxin mérésre alkalmasak a fluoreszcenciás vagy tömegspektrometriás detektálást alkalmazó (HPLC-FLD, HPLC-MS) módszerek. A HPLC fluoreszcenciás detektálási módja sikeresen alkalmazható a ZEA és származékai esetében, köszönhetően azok természetes fluoreszkálásának. Több toxin vizsgálatára alkalmas módszer a HPLC/MSMS, mely egy kromatográfiai elválasztást alkalmaz, kiegészítve a további szelekciót lehetővé tevő két tömegspektrométerrel.

Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy bármilyen módszert is választunk a mennyiségi meghatározásra, a toxinok egy adott tételben igen kis mennyiségben - egy milliárd részből egy rész, azaz mikrogram/kg mennyiségben-, és egyenetlen eloszlással fordulnak elő. Annak ellenére, hogy egyes gabonaszemekben a mikotoxinok szintje kiugróan magas, összességében egy nagyobb gabonátételben a mikotoxin-koncentráció általában nagyon alacsony lehet. Éppen ezért megfelelő mintavétellel, laborhátterrel, szakmailag helyes mintaosztással, mintakezeléssel és minta-előkészítéssel jelentős mértékben javítható az eredmények megbízhatósága.